

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
Please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 197 27 962 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 12 N 5/10**  
C 07 K 14/435  
C 12 N 15/85  
C 12 Q 1/18  
C 12 Q 1/02  
A 01 K 67/027

②① Aktenzeichen: 197 27 962.7  
②② Anmeldetag: 2. 7. 97  
②③ Offenlegungstag: 14. 1. 99

DE 197 27 962 A 1

⑦① Anmelder:  
Hescheler, Jürgen, Prof. Dr. (Univ.), 50968 Köln, DE  
  
⑦④ Vertreter:  
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,  
50667 Köln

⑦② Erfinder:  
gleich Anmelder  
  
⑤⑥ Entgegenhaltungen:  
Development 124, S.1133-1137, 1997;  
Blood 88 (10 Suppl. 1 Part 1-2) 1996, 295B;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Fluoreszierende Proteine als zelltypspezifische Reporter

⑤⑦ Die Erfindung betrifft embryonale Stammzellen (ES-Zellen) nicht-menschlicher Säuger, die mit einem DNA-Konstrukt stabil transfiziert sind, das eine für ein nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein codierende DNA-Sequenz und einen mit dieser DNA-Sequenz operativ verknüpften, zell- und/oder entwicklungsabhängigen Promotor umfaßt; ein Verfahren zur Herstellung dieser ES-Zellen; eine Zellkultur erhältlich durch Kultivieren der ES-Zellen; ein Verfahren zur toxikologischen Prüfung von Substanzen unter Verwendung dieser Zellkulturen; ein Verfahren zur Erzeugung transgener nicht-menschlicher Säuger unter Verwendung der ES-Zellen; einen durch dieses Verfahren erhältlichen transgenen nicht-menschlichen Säuger und ein Verfahren zur Untersuchung von Zellentwicklungsstufen unter Verwendung von Zellen eines solchen nicht-menschlichen Säugers.

DE 197 27 962 A 1

AN

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von nicht-zellschädigenden fluoreszierenden Proteinen als zelltypspezifische Reporter. Im einzelnen betrifft die Erfindung embryonale Stammzellen (ES-Zellen) nicht-menschlicher Säuger, die mit einem DNA-Konstrukt stabil transfiguriert sind, das eine für ein nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein codierende DNA-Sequenz und einen mit dieser DNA-Sequenz operativ verknüpften, zell- und/oder entwicklungsabhängigen Promotor umfaßt: ein Verfahren zur Herstellung dieser ES-Zellen; eine Zellkultur erhältlich durch Kultivieren der ES-Zellen; ein Verfahren zur toxikologischen Prüfung von Substanzen unter Verwendung dieser Zellkulturen; ein Verfahren zur Erzeugung transgener nicht-menschlicher Säuger unter Verwendung der ES-Zellen; einen durch dieses Verfahren erhältlichen transgenen nicht-menschlichen Säuger und ein Verfahren zur Untersuchung von Zellentwicklungsstufen unter Verwendung von Zellen eines solchen nicht-menschlichen Säugers.

Embryonale Stammzellen (ES) sind Grundlage sowohl für die Erzeugung transgener Tiermodelle, als auch für den Einsatz in in vitro Zellkultursystem. Bis her wurden die sich aus ES-Zellen differenzierenden Zelltypen dadurch identifiziert, daß sie durch Antikörperfärbung bzw. durch in situ-Hybridisierung mit Antisense-Oligonukleotiden gekennzeichnet wurden. Dazu mußten allerdings die Zellen zuvor fixiert werden.

Alle bisherigen Verfahren eignen sich nicht für anschließende funktionelle Untersuchungen mit den von ES-Zellen differenzierten, unterschiedlichen Zelltypen. Die bisher einzige Methode, um funktionelle Untersuchungen an ES-Zell-abgeleiteten Zellderivaten in vivo durchzuführen, bestand in der morphologischen Identifizierung. Dies gelang, wenn auch nur sehr unbefriedigend, bei den Herz- und Skelettmuskelzellen; da diese sich durch Kontraktionen auszeichneten. Schon bei den nicht kontrahierenden Ventrikelzellen war die Erkennung für funktionelle Untersuchungen schwierig. So wird im Maltsev et al., 1994, Circ Res., 75, 233-244 und DD-299439 AS ein Modell beschrieben, in dem die Differenzierung von Herzzellen (Kardiomyozyten) ausgehend von einer sehr frühen Entwicklungsstufe bis zur spezialisierten Schrittmacher-, ventrikulären-, oder atrialen Herzzelle in vitro stattfindet (Maltsev et al., 1994, Circ Res., 75, 233-244). Zu diesem Zweck werden totipotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Zelllinie D3 unter den folgenden Zellkulturbedingungen in Kardiomyozyten differenziert: Die Zellen werden 2 Tage in einem hängenden Tropfen angesetzt, dann 5 Tage in Suspension gehalten und anschließend ausplattiert (Maltsev et al., 1994, Circ Res., 75, 233-244). Innerhalb von 1-2 Tagen nach der Plattierung bilden sich spontan schlagende Areale innerhalb dieser "Embryoid Bodies" (EB's). Aus diesen Arealen können mit Hilfe enzymatischer Verdauung (Kollagenase) einzelne Kardiomyozyten dissoziiert werden, die funktionellen, molekularbiologischen und morphologischen (Immunhistochemie, Elektronenmikroskopie) Untersuchungstechniken während den verschiedenen Differenzierungsstadien zugänglich sind. Neben den Kardiomyozyten befinden sich in den so erzeugten EB's unter anderem auch neuronale Zellen, Gliazellen, hämatopoietische Zellen, Endothelzellen (frühe Kapillare), glatte Muskelzellen, Skelettmuskelzellen, Knorpelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen.

Darüber hinaus sind in der letzten Zeit biolumineszente Proteine wie Green Fluorescent Protein (nachfolgend GFP) beschrieben worden (Prasher et al., Gene, Vol. 111 229-233 (1992), die als Marker für Genexpression vorgeschlagen werden (Chalfie et al., Science, Vol. 263, 802-805 (1994)).

So ist in der WO-A-95107463 und WO-A-96/27675 das Transformieren von Zellen mit GFP offenbart. Die Transformation von Säugerzellen, insbesondere deren ES-Zellen mit einer für GFP codierenden DNA-Sequenz ist jedoch weder in dieser noch in einer anderen Druckschrift beschrieben worden.

Herz-Kreislaufkrankungen gehören immer noch zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrieländern. Nur durch intensive Grundlagenforschung auf diesem Gebiet können die pathophysiologischen Ursachen erkannt und neue Therapieansätze gefunden bzw. toxikologische Veränderungen beschrieben werden. Für die Untersuchung zur Pathogenese von Herz-Kreislauf Erkrankungen und zum Testen neuer pharmakologischer und toxikologischer Substanzen werden Modelle benötigt, die einerseits auf den Menschen übertragbar sind, andererseits aber die aufwendigen und kostenintensiven Tierversuchsmodelle ersetzen können. Im Jahr 1991 wurden noch über 2 Millionen Tiere allein in den alten Bundesländern bei Tierversuchen eingesetzt.

Ein in letzter Zeit immer wichtigerer Ansatzpunkt der pharmakologisch/toxikologischen Forschung ist die Herzdifferenzierung. Aus der stereotypisch ablaufenden Herzzellentwicklung können Rückschlüsse auf pathologische und toxikologische Veränderungen von Kardiomyozyten gezogen werden. So ist z. B. bekannt, daß bei der kardialen Hypertrophie (Yamazaki et al., J. Mol. Cell Cardiol. 27 (1): 133-140 (1995)) und Herzinsuffizienz (Johnson et al., Biochem. Pharmacol. 45 (12): 2365-2372 (1993)) der Rezeptorstatus und die intrazellulären Signalkaskaden gestört sind. Diese pathologisch veränderten Kardiomyozyten ähneln teilweise wieder Herzzellen früher Differenzierungsstadien.

Die zur Aufklärung der Eigenschaften von Herzzellen früher Differenzierungsstadien notwendigen Untersuchungen können am Tier jedoch technisch nur schwer und, falls überhaupt, in sehr aufwendigen Studien durchgeführt werden: Am 12.-13. Tag ist es frühestens möglich, Kardiomyozyten aus einem Mäuseembryo zu präparieren, diese Zellen entsprechen jedoch nicht mehr einer frühen kardialen Differenzierungsstufe. Eine detaillierte Analyse der Rezeptorexpression während verschiedener Differenzierungsstadien erfordert einen sehr hohen Aufwand an Tiermaterial und ist - wie vorstehend ausgeführt - technisch nur schwer durchführbar. Ebenso ist die Beobachtung der Entwicklung einer relativ undifferenzierten Herzzelle über mehrere Tage bis Wochen hinweg am Tiermodell nicht möglich. Um den Einsatz neuer Therapeutika, z. B. inotroper Substanzen oder Antiarrhythmika bzw. toxischer Stoffe, z. B. Schwermetalle oder Retinoide, auszuwerten, muß im Tierversuch ein wochenlanges, invasives Monitoring an Tieren z. B. Schweinen durchgeführt werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand nun darin, ein Zellkulturverfahren bereitzustellen, das eine einfache Charakterisierung der lebenden Zellen ermöglicht und funktionelle Untersuchungen zuläßt und nicht wie die bisherigen Verfahren auf Reportergenen wie z. B. Lac-Z (Niwa et al., 1991, Gene 108, 193-199; Wobus et al., 1996, J. Cell Mol. Cardiol.; Metzger et al., 1996 Circ. Res., 78, 547-552) beruht, deren Expression nur nach Zellfixierung und unter Zuhilfenahme eines spezifischen Substrates nachgewiesen werden kann.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß ES-Zellen mit einem DNA-Konstrukt, in dem ein für ein nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein codierendes Gen mit einem zell- und entwicklungsabhängigen Promotor gekoppelt ist, mittels Elektroporation stabil transfiguriert werden können. Dieses Konstrukt wird dabei in die native DNA integriert. Nach spezifischer Aktivierung intrazellulärer Signale wird

der Promotor aktiviert und das fluoreszierende Protein exprimiert. Somit können ES-Zellen, die zu einem gewissen Zeitpunkt der Differenzierung einen zellspezifischen Transkriptionsfaktor aktivieren, anhand der Fluoreszenz-Emission unter Fluoreszenzanregung erkannt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit embryonale Stammzellen (ES-Zellen) nichtmenschlicher Säuger, die mit einem DNA-Konstrukt, umfassend

- eine für ein nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein codierende DNA-Sequenz und
- einen mit dieser DNA-Sequenz operativ verknüpften, zell- und/oder entwicklungsabhängigen Promotor

stabil transfiziert sind.

Bevorzugt stammen die ES-Zellen von Nagern, insbesondere von Mäusen. Besonders bevorzugte ES-Zellen sind dabei D3-Zellen (Doetschmann et al., J. Embryol. Exp. Morphol. 87, 27 (1985)), R1-Zellen (Nagy et al., PNAS (1995)), E14-Zellen (Handyside et al., Roux Arch. Develop. Biol. 198, 48 (1989)), CCE-Zellen (Bradley et al., Nature 309, 255 (1985)) und P19-Zellen (Mummary et al., Dev. Biol. 109, 402 (1985)).

Als "nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein" können gemäß der vorliegenden Erfindung das Green Fluorescent Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea Victoria* (beschrieben in WO-A-95/07463, WO-A-96/27675 und WO-A-95121 191) und dessen Derivate "Blue GFP" (Heim et al., Curr. Biol. 6 (2): 178-182 (1996)) und Redshift GFP" (Muldoon et al., Biotechniques 22 (1): 162-167 (1997)) verwendet werden. Bevorzugt ist dabei das grün fluoreszierende GFP, insbesondere die in dem hinterlegten Stamm DSM 11633 befindliche GFP-Mutante.

Unter den Begriff "zell- und/oder entwicklungsabhängiger Promotor" ist gemäß der vorliegenden Erfindung ein Promotor zu verstehen, der nur in gewissen Zelltypen und/oder nur in gewissen Zellentwicklungsstadien - sowohl in Zellkulturen (Embryoid Bodies) als auch in transgenen nicht-menschlichen Säugern, die von den erfindungsgemäßen ES-Zellen abstammen - seine Promotoraktivität entfaltet. Daneben kann aber auch jeder andere bekannte zellspezifische Promotor für z. B. Nervenzellen, Herzzellen, neuronale Zellen, Gliazellen, hämatopoietische Zellen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Skelettmuskelzellen, Knorpelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen eingesetzt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Promotor ein für Herzzellen spezifischer Promotor. Insbesondere sind die folgenden Promotoren zu nennen: SMHC Minimal Promotor (spezifisch für Glattmuskelzellen, Kallmeier et al., J. Biol. Chem. 270 (52): 30949-30957 (1995)); Nkx-2.5 (spezifisch für sehr frühe Kardiomyozyten, Lints et al., Development, 119 (2): 419-431 (1993)); Human- $\alpha$ -Actin (spezifisch für Herzwert, Sartorelli et al., Genes Dev., 4 (10): 1811-1822 (1990)), MLC-2V (spezifisch für Herzkammern, O'Brien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 (11): 5157-5161 (1993) und WO-A-96/16163).

In einer bevorzugten Ausführungsform weist das DNA-Konstrukt noch weitere funktionelle DNA-Sequenzen, insbesondere Enhancer und Selektionssequenzen auf. Solche Selektionssequenzen sind z. B. Neomycin und Hygromycin.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin, ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen ES-Zellen, umfassend

- Einbringen eines vorstehend definierten DNA-Konstrukts in Ausgangs-ES-Zellen nicht-menschlicher Säuger und
- Screenen nach stabil transfizierten ES-Zellen. Das

Einbringen kann dabei auf jede dem Fachmann bekannte Art und Weise erfolgen. Die Elektroporation ist jedoch bevorzugt. Das Screenen erfolgt vorzugsweise mit Hilfe der in dem DNA-Konstrukt vorhandenen Selektionssequenzen.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das vorstehend beschriebene DNA-Konstrukt. Bevorzugte Konstrukte sind dabei die in Fig. 1 und 2 abgebildeten Reporterkonstrukte pCX-( $\beta$ -actin)GFP-Neo und pCX-( $\alpha$ -actin)GFP-Neo (DSM 11633).

Die Erfindung betrifft ebenfalls eine Zellkultur mit zelltypspezifischer Expression eines nicht-zellschädigenden fluoreszierenden Proteins erhältlich durch Kultivieren der erfindungsgemäßen ES-Zellen. In einer bevorzugten Ausführungsform liegen die Zellen als Aggregate (Embryoid Bodies) vor. Das Herstellen des Embryoid Bodies erfolgt dabei gemäß Standardverfahren wie z. B. die Methode des "hängenden Tropfens" oder Methylzellulosekultur (Wobus et al., Differentiation (1991) 48, 172-182).

Diese Zellstrukturen können in Verfahren zur toxikologischen Untersuchung von Substanzen, z. B. Retinoide, Schwermetall und Pharmaka, verwendet werden. Sie besitzen wesentliche Vorteile gegenüber allen bisher verwendeten Zellkulturmodellen:

a) Die lebenden, unfixierten Zellen können in ihrer Differenzierung beobachtet werden, so kann z. B. das Wachstum der Herzzellen im schlagenden Areal kontinuierlich beobachtet werden.

b) Zellen im frühen Entwicklungsstadium können elektrophysiologischen und anderen Meßmethoden zugänglich gemacht werden, da sie als fluoreszierende Zellen leicht zu erkennen sind (siehe Fig. 3). Dies bedeutet eine wesentliche Vereinfachung der funktionellen Untersuchung dieser Zellen.

c) Eine Einzelzell-Präparation bedeutet einen Verlust von Zellen. Um die geringe Zahl der noch vorhandenen Zellen sichtbar zu machen, sind die das fluoreszierende Protein exprimierenden Zellen vorteilhaft. Das Verfahren läßt sich durch die FACS-Sortierungsmethode ergänzen, wodurch homogene Zellpopulationen gewonnen werden können. Dadurch ist es auch möglich Untersuchungen (z. B. molekularbiologische) an einer größeren Population von phänotypisch differenzierten ES-Zellen vorzunehmen.

d) Da die das fluoreszierende Protein exprimierenden ES-Zellen nach Aktivierung herzspezifischer Promotoren im EB sichtbar werden, kann das Wachstum der herzspezifischen Zellen unter pharmakologisch/toxikologischen Bedingungen in einem recht einfachen Verfahren bestimmt werden. Für routinemäßige Untersuchungen der Wirkung verschiedener Substanzen auf die Herzzelldifferenzierung könnte das Areal im EB von fluoreszierendes Protein exprimierenden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden und somit Aussagen gemacht werden, ob diese Substanzen die Differenzierung von Herzzellen quantitativ und qualitativ beeinflussen. Für quantitativ präzisere Aussagen könnten die Zellen dissoziiert und dann der FACS-Sortierungstechnik unterzogen werden (Fig. 4).

Die Erfindung betrifft schließlich ein Verfahren zur Erzeugung transgener nichtmenschlicher Säuger mit zelltypspezifischer Expression eines nicht-zellschädigenden fluoreszierenden Proteins, umfassend

- Injizieren von erfindungsgemäßen ES-Zellen in Bla-

stozysten von nicht-menschlichen Säugern und  
 - Übertragen der Blastozysten in Leihmütter; die durch dieses Verfahren erhältliche transgene nicht-menschliche Säuger sowie ein Verfahren zur Untersuchung von Entwicklungsstufen von Zellen nicht-menschlicher Säuger, umfassend die Untersuchung der entsprechenden gekennzeichneten Zellen von erfindungsgemäßen nichtmenschlichen Säugern durch fluorimetrische Verfahren.

Im Ganztier kann durch das erfindungsgemäße Untersuchungsverfahren erstmals in vivo eine genaue Zelltypisierung vorgenommen werden. So sollten bereits in den frühen Organanlagen der Embryonen fluoreszierende Herzzellen beobachtet werden, was eine in vivo Beobachtung der Herzentwicklung in der frühembryonalen Phase möglich machen würde. Auch dadurch könnten zu verschiedenen Entwicklungsstufen die Herzzellen leicht identifiziert werden.

Die Erfindung wird weiterhin durch folgende Figuren und Beispiele erläutert.

Fig. 1 zeigt den in Beispiel 1 verwendeten Reporter-gen-konstrukt pCX-( $\beta$ -act)GFP-Neo.

Fig. 2 zeigt den in Beispiel 2 verwendeten Reporter-gen-konstrukt pCX-( $\alpha$ -act)GFP-Neo (DSM 11633).

Fig. 3. Teil A: Gezeigt sind 2 junge EBs in Suspension unter transmittiertem Licht (Aa) und unter 488 nm Exzitation (Ab). Da sich in diesen frühen EBs noch keine Herzzellen differenziert haben, ist keine grüne Fluoreszenz sichtbar.

Teil B: EB nach 3 Tagen Plattierung (7+3 Tage) unter transmittiertem Licht (Ba), bei 488 nm Fluoreszenz-exzitation (Bb) und in Kombination von transmittiertem Licht und 488 nm Fluoreszenz-exzitation. In diesem EB konnte ein relativ kleines, spontan schlagendes Areal beobachtet werden. Dies entspricht dem Teil des EB mit spontanen Kontraktionen. Die EBs wurden mit einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen.

Fig. 4: Gezeigt sind die mittels FACS-Methode erstellte Verteilungshistogramme von Zellen aus EB's, die aus ES-Zellen mit pCX-( $\alpha$ -act)GFP-Neo gewonnen wurden. Das Konstrukt wurde mittels AatI linearisiert, so daß der CMV-IE Enhancer zerstört wurde.

- (a) ES-Zellen
  - (b) nach 2 Tagen Suspension (2+2 Tage)
  - (c) 5 Tage nach Plattieren (7+5 Tage)
- x-Achse: Intensität der GFP Fluoreszenz (FACS-Einheiten), y-Achse: gezählte Zellen

Beispiele

Beispiel 1

Herstellung stabiler ES-Zelllinien, die GFP unter einem starken ubiquitären Promotor exprimieren, und Differenzierung und Eigenschaften von Kardiomyozyten, die von diesen Zellen abstammen.

- a) Herstellen des GFP-Expressions-Konstrukts: Der von Dr. Okabe (University of Osaka, Japan) zur Verfügung gestellte pCX-GFP-Expressionsvektor, der eine GFP-codierende Sequenz unter einem Huhn- $\alpha$ Actin-Promotor enthält (M. Ikawa, K. Kominami, Y. Yoshimura, K. Tanaka, Y. Nishimura und M. Okabe, Develop. Growth Differ. (1995) 37, 455-459), wurde wie folgt modifiziert:  
 Ein SalI-XbaI-Restriktionsfragment, das ein Neomycin-(G418)-Resistenz-Gen von pTL2Neo enthält (von Dr. Tarakhovsky zur Verfügung gestellt), wurde durch

Ligasierung mit glatten Enden in die SalI-Stelle von pCX-GFP eingesetzt. Das resultierende Konstrukt pCX-( $\beta$ -act)GFP-Neo (Fig. 1) wurde für die Elektroporation von D3-Zellen verwendet.

- b) Elektroporation und Selektionsverfahren: Das pCX-( $\beta$ -act)GFP-Neokonstrukt wurde mit Restriktase ScaI linearisiert (außerhalb der GFP-Expressions-cassette) und für die Elektroporation der D3-Linie von ES-Zellen unter den folgenden Bedingungen verwendet:  
 DNA: 20-40  $\mu$ g, Zellen:  $7 \times 10^6$ /ml in 0.8 ml PBS-Puffer, Elektroporationsküvette BioRad 0.4 cm (Kat.-Nr. 165-2088), Elektroporationsapparat BioRad (Gen Pulser), 240 V, 500  $\mu$ F.

Nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension 20 min auf Eis gelegt und dann auf eine 10-cm-Petrischale mit Gewebequalität mit G418-Resistenz-Feederschicht in 10 ml DMEM-Medium mit 15% FCS (Kälberfetusserum) übertragen. Zwei Tage später wurde 300  $\mu$ g/ml Neomycin (G418, Gibco) hinzugefügt um G418-resistente Zellen zu selektieren. Das Medium mit G418 (300  $\mu$ g/ml) wurde jeden zweiten Tag ausgetauscht. Nach 8 bis 10 Tagen Selektion erschienen wirkstoffresistente Kolonien, die durch Fluoreszenzmikroskopie auf GFP-Expression getestet wurden.

Etwa 95% der G418-resistenten Kolonien zeigten eine starke GFP-Expression (grünes Leuchten), was auf ein hohes Ausmaß an Aktivität des  $\beta$ -Actin-Promotors ( $\beta$ -Actin ist eines der Hauptproteine des Cytoskeletts) in ES-Zellen hinweist. Die Kolonien wurden durch Ansaugen mit einer Pasteur-Pipette aufgenommen, einzeln trypsinisiert und anschließend für die Vermehrung auf 48- und 24-Napf-Platten mit Feederschichten mit G418 (300  $\mu$ g/ml) übertragen. Schließlich wurden mehrere stabile ES-Klone, die 1 bis 5 Kopien des GFP-Gens unter der Kontrolle des Huhn- $\beta$ -Actin-Promotors trugen, ermittelt und zur Erzeugung embryoider Körper (EBs) verwendet.

- c) Differenzierung und Analyse der Kardiomyozyten: EBs wurden nach dem Standardverfahren der "hängenden Tropfen" entwickelt (A. Wobus, G. Walluka und J. Hescheler, Differentiation (1991) 48, 173-182).

In allen Stadien der Entwicklung vor dem Ausstreichen zeigten die EBs, die von ES-Zellen mit integriertem GFP-Expressionsvektor unter der Kontrolle des  $\beta$ -Actin-Promotors abstammten, unter dem Fluoreszenzmikroskop ein starkes grünes Leuchten. Nach dem Ausstreichen verteilte sich die GFP-Expression in ungleichen Anteilen zwischen verschiedenen Zelltypen, die im Laufe der Differenzierung auftraten. Das hellste grüne Leuchten in EBs nach dem Auftreten kontraktiler Myocardiocyten fällt mit entsprechenden schlagenden Bereichen und nicht mit schlagenden Kernteilen (zentralen Teilen) von EBs zusammen.

Andere Bereiche der EBs zeigen verschiedene Ausmaße der GFP-Expression von stark bis schwach, was auf die bekannte weit verbreitete Expression von  $\beta$ -Actin als Hauptkomponente des Cytoskeletts bei vielfältigen Zelltypen hinweist.

Diese visuellen Beobachtungen werden durch Histogramme der Verteilung der GFP-Expression in den Zellpopulationen in den sich entwickelnden EBs bestätigt, die man durch FACS-Analyse (Flow Cytometry) erhält. Sie zeigen die Linksverschiebung und Vergrößerung anfangs scharfer, symmetrischer Peaks des Histogramms, was einen Übergang von hoher und relativ homogener GFP-Expression in einer Population proliferierender undifferenzierter ES-Zellen zu einer breiten Verteilung derselben auf die Population sich differenzierender Zelltypen anzeigt.

EBs wurden mittels Kollagenase dissoziiert und auf Objektträgern ausgestrichen und anschließend 2-3 Tage lang kultiviert, bevor elektrophysiologische Messungen nach dem Standardverfahren vorgenommen wurden (V. Malisev, A. Wobus, J. Rohwedde, M. Bader und J. Hescheler; Circ. Res. (1994) 75 (2), 233-244).

Isolierte, spontan schlagende Kardiomyozyten, die GFP stark exprimieren, weisen alle elektrophysiologischen Eigenschaften auf, die für Kardiomyozyten typisch sind einschließlich Aktionspotentialen,  $Ca^{2+}$ -,  $Na^{+}$ -,  $K^{+}$ - und  $I_{f}$ -Strömen, was durch die Patch-Clamp-Technik gezeigt wurde.

Stabile ES-Zelllinien, die aufgrund eines in das Genom integrierten Expressionsvektors GFP stark exprimieren, können sich also zu funktionell reifen kontraktile Kardiomyozyten differenzieren, die dieselben elektrophysiologischen Grundeigenschaften haben wie Kardiomyozyten, die sich aus "normalen" D3-Zellen differenzieren: haben.

## Beispiel 2

Herstellung stabiler ES-Zelllinien, die GFP unter einem herzspezifischen Promotor in sich differenzierenden Kardiomyozyten exprimieren.

a) Herstellen des GFP-Expressions-Konstrukts: Aus dem von Dr. M. McBurney (University of Ottawa, Kanada) zur Verfügung gestelltem Plasmid pPv/B-Act-lacZ, das das Segment (-440/+6) des herzspezifischen Human- $\alpha$ -Actin-Promotors enthielt (A. Minty, L. Kedes; Molecular and Cellular Biology (1986) 6, 2125-2136; G. Pari, K. Jardine und M. McBurney; Molecular and Cellular Biology (1991) 11, 4796-4803), wurde der Promotor durch die Restriktionsenzyme SalI und HindIII herausgeschnitten. Der pCX-GFP-Expressionsvektor (siehe Beispiel 1) wurde - um den Huhn- $\beta$ -Actin-Promotor durch den herzspezifischen  $\alpha$ -Actin-Promotor zu ersetzen - mit den Restriktasen SnaBI und ApaI gespalten, wobei der Huhn- $\beta$ -Actin-Promotor herausgeschnitten wurde. Nachfolgend wurde durch Ligasierung mit glatten Enden das oben genannte SalI-HindIII-Fragment des herzspezifischen  $\alpha$ -Actin-Promotors eingefügt. Die Restriktasen Tth111I, SalI und HinfI wurden verwendet, um Plasmidklone zu selektieren, bei denen der herzspezifische  $\alpha$ -Actin-Promotor in der richtigen Orientierung zur GFP-codierenden Sequenz eingesetzt war. Dann wurde ein Neomycin-(G418)-Resistenz-Gen, wie in Beispiel 1a) beschrieben, in die SalI-Stelle eingesetzt, und das resultierende Plasmid pCX-( $\alpha$ -act)GFP-Neo (Fig. 2) wurde für die Elektroporation von D3-Zellen verwendet.

b) Elektroporation und Selektionsverfahren: Das pCX-( $\alpha$ -act)GFP-Neo wurde mit Scal (außerhalb der GFP-Expressions-cassette, wie in Beispiel 1b) beschrieben) oder mit AatI linearisiert, um den Cytomegalovirus-(CMV-IE)-Enhancer zu zerstören (siehe unten). Die Elektroporation und das G418-Selektionsverfahren wurden, wie in Beispiel 1b) beschrieben, durchgeführt.

c) Analyse der Zellpopulation und GFP-Expression unter der Kontrolle des herzspezifischen  $\alpha$ -Actin-Promotors während der Differenzierung von Kardiomyozyten: EBs wurden, wie in Beispiel 1c) beschrieben, entwickelt. Im Unterschied zu den oben beschriebenen Mustern der GFP-Expression unter der Kontrolle des  $\beta$ -Actin-Promotors weisen ES-Zellen, die das in das Genom integrierte pCX-( $\alpha$ -act)GFP-Neo tragen, kein oder nur ein sehr schwaches durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbares Signal auf. Die FACS-Analyse zeigt,

daß das mittlere Niveau der grünen Fluoreszenz von D3-Zellen mit durch SacI linearisiertem pCX-( $\alpha$ -act)GFP-Neo etwa 35- bis 40mal geringer ist als bei Zelllinien, die pCX-( $\beta$ -act)GFP-Neo tragen. Während der Entwicklung der EBs wurde eine Rechtsverschiebung und Vergrößerung des Anfangspeak des durch FACS erhaltenen GFP-Fluoreszenz-Histogramms erhalten. Die schlagenden Bereiche, die 2 bis 4 Tage nach dem Ausschleichen der EBs auftraten, zeigten ein durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbares grünes Leuchten, das mit dem Niveau der GFP-Expression in ES-Zellen, die pCX-( $\beta$ -act)GFP-Neo tragen, vergleichbar ist. Möglicherweise sind die schlagenden Bereiche, die aus funktionell reifen Kardiomyozyten bestehen, nur Bereiche mit starkem sichtbarem Leuchten unter anderen Zelltypen in sich entwickelnden EBs. Bei täglicher Überwachung ist es möglich, 1 bis 1,5 Tage, bevor sie zu schlagen beginnen, getrennte leuchtende Bereiche nachzuweisen.

Der herzspezifische Charakter der GFP-Expression wurde durch  $\alpha$ -Actin-spezifisches Immun-Anfärben einzelner Zellen bestätigt, das mit der GFP-Expression unter der Kontrolle des herzspezifischen  $\alpha$ -Actin-Promotors korreliert.

d) Herstellung von ES-Zelllinien mit geringem ursprünglichem unspezifischem Niveau der GFP-Expression: Die oben genannten ES-Klone mit integriertem pCX-( $\alpha$ -act)GFP-Neo zeigten eindeutige Kardiomyozyten-spezifische Expressionsmuster, was zu einem erkennbaren Zusammenfallen leuchtender und schlagender Bereiche führte. Das anfängliche Niveau der GFP-Expression dieser undifferenzierten Zellen, das 5- bis 10mal höher liegt als bei einer negativen Kontrolle (intakte ES-Zellen), könnte jedoch das Auffinden der Zellen bei den allerersten Schritten der Differenzierung behindern.

Um das ursprüngliche Niveau der unspezifischen GFP-Expression zu senken, wurde eine Anzahl neuer Zelllinien erzeugt, wobei pCX-( $\alpha$ -act)GFP-Neo verwendet wurde, das mit AatI-Restriktase linearisiert wurde (Fig. 2), um eine Zerstörung des CMV-IE-Enhancers zu ermöglichen. Letzterer war im ursprünglichen Expressionsvektor vorhanden, und es wurde angenommen, daß er der Grund für den anfänglichen unspezifischen "Hintergrund" war.

Nach der Elektroporation und dem Selektionsverfahren zeigten die G418-resistenten Klone eine viel höhere Diversifikation der anfänglichen GFP-Expression als Klone mit intaktem CMV-IE-Enhancer. Mehrere ES-Klone mit niedrigstem "Hintergrund" wurden durch FACS-Screening ausgewählt. Diese Klone haben eine etwa 5mal niedrigere Anfangsfluoreszenzintensität und könnten mit Zellen der negativen Kontrolle (Wildtyp) ohne GFP-Vektor vergleichbar sein. Nach der Herstellung von EBs aus entsprechenden ES-Zellklonen zeigten mehrere davon eine sowohl durch Fluoreszenzmikroskopie als auch durch FACS-Analyse nachweisbare GFP-Expression in sich differenzierenden Kardiomyozyten. Die FACS-Analyse zeigt eine hohe Auflösung zwischen Zellen, die zur herzspezifischen Differenzierung übergegangen sind, und dem Rest der Zellpopulation, die während der EB-Entwicklung den ausgeprägten eins-zu-zwei-Peakcharakter der Histogrammdynamik zeigten (Fig. 4).

Der beschriebene Ansatz erlaubt es also, die Differenzierung von ES-Zellen zu Kardiomyozyten "in vitro" zu untersuchen, wobei der GFP-Expressionsvektor mit herzspezifischem

schem Promotor als "lebendes" Reporter-Genesystem verwendet wird, der Zellen in den früheren Schritten der Entwicklung sichtbar macht.

Das vorstehend beschriebene Plasmid pCX-( $\alpha$ -act)GFP-Neo wurden am 27.06.97 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, unter der Bezeichnung DSM 11633 hinterlegt.

#### Patentansprüche

1. Einbryonale Stammzellen (ES-Zellen) nicht-menschlicher Säuger, die mit einem DNA-Konstrukt, umfassend
  - eine für ein nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein codierende DNA-Sequenz und
  - einen mit dieser DNA-Sequenz operativ verknüpften, zell- und/oder entwicklungsabhängigen Promotor
 stabil transfiziert sind.
2. ES-Zellen gemäß Anspruch 1, wobei die ES-Zellen von Nagern, insbesondere von Mäusen, stammen.
3. ES-Zellen gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das nicht-zellschädigende fluoreszierende Protein ausgewählt ist aus Green Fluorescent Protein (GFP), Red Fluorescent Protein und Blue Fluorescent Protein und insbesondere GFP ist.
4. ES-Zellen gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Promotor ein für Herzzellen, neuronale Zellen, Gliazellen, hämatopoietische Zellen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Skelettmuskelzellen, Knorpelzellen, Fibroblasten oder Epithelzellen spezifischer Promotor ist, insbesondere ein für Herzzellen spezifischer Promotor ist.
5. ES-Zellen gemäß Anspruch 5, wobei der Promotor ausgewählt ist aus den Promotoren Nkx-2.5, Human- $\alpha$ -Actin und MLC-2V und insbesondere der herzspezifische Human- $\alpha$ -Actin Promotor ist.
6. ES-Zellen gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das DNA-Konstrukt weitere funktionelle DNA-Sequenzen, insbesondere Enhancer- und Selektionssequenzen, aufweist.
7. Verfahren zur Herstellung der ES-Zellen gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend
  - Einbringen eines wie in Anspruch 1 und 3 bis 6 definierten DNA-Konstrukts in Ausgangs-ES-Zellen nicht-menschlicher Säuger und
  - Screenen nach stabil transfizierten ES-Zellen.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Einbringen durch Elektroporation erfolgt.
9. DNA-Konstrukt gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 und 3 bis 6.
10. DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es Plasmid pCX-( $\alpha$ -act)GFP-Neo (DSM 11633) ist.
11. Zellkultur mit zelltypspezifischer Expression eines nicht-zellschädigenden fluoreszierenden Proteins erhältlich durch Kultivieren der ES-Zellen gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6 in vitro.
12. Zellkultur gemäß Anspruch 11, wobei die Zellen als Aggregate vorliegen.
13. Verfahren zur toxikologischen Prüfung von Substanzen, umfassend die Untersuchung der Auswirkungen dieser Substanzen auf Zellkulturen gemäß Ansprüchen 11 oder 12 mittels fluorimetrischer Verfahren.
14. Verfahren zur Erzeugung transgener nicht-menschlicher Säuger mit zelltypspezifischer Expression eines nicht-zellschädigenden fluoreszierenden

Proteins, umfassend

- Injizieren von ES-Zellen gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6 in Blastozysten von nicht-menschlichen Säugern und
  - Übertragen der Blastozysten in Leihmütter.
15. Transgene nicht-menschliche Säuger erhältlich durch das Verfahren gemäß Anspruch 14.
16. Verfahren zur Untersuchung von Entwicklungsstufen von Zellen nichtmenschlicher Säuger, umfassend die Untersuchung der entsprechenden gekennzeichneten Zellen von nicht-menschlichen Säugern gemäß Anspruch 15 durch fluorimetrische Verfahren in vitro.

---

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

---



FIG. 1

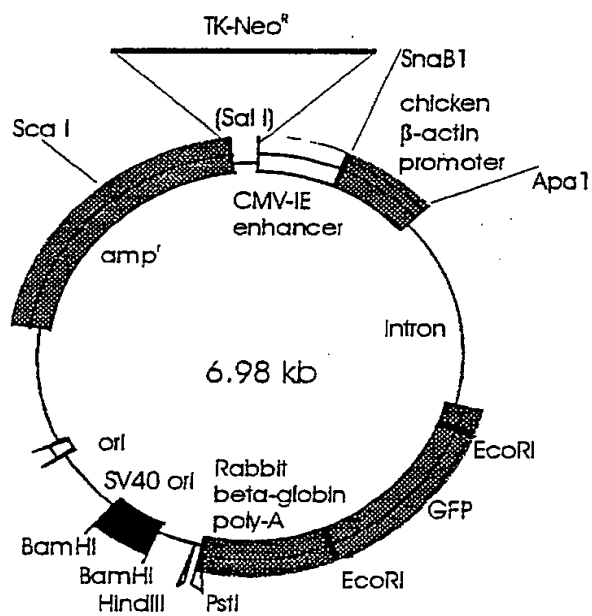
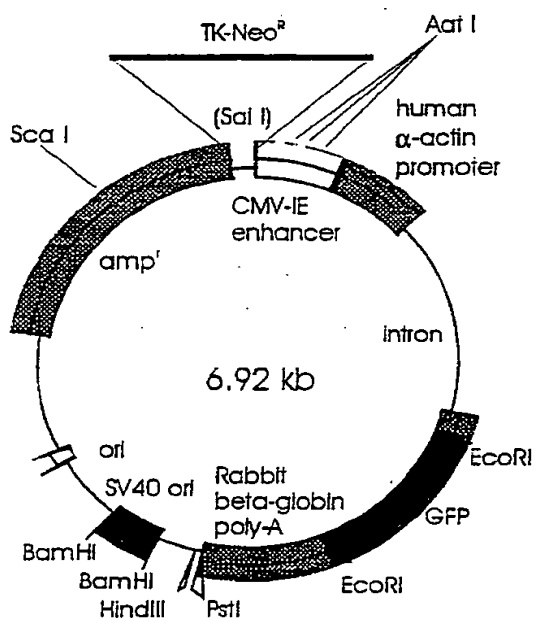


FIG. 2



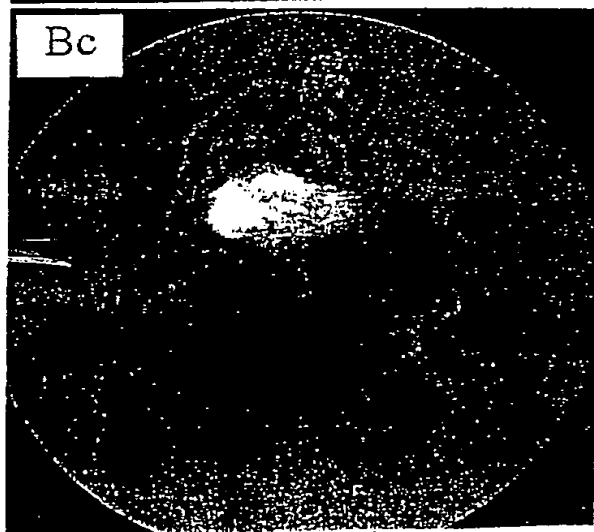
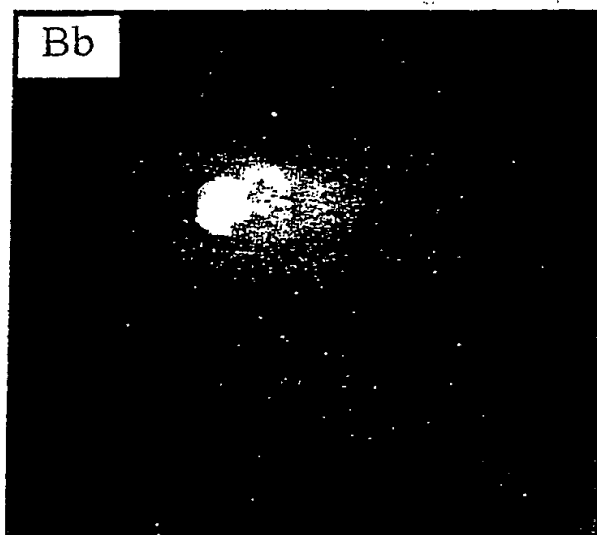
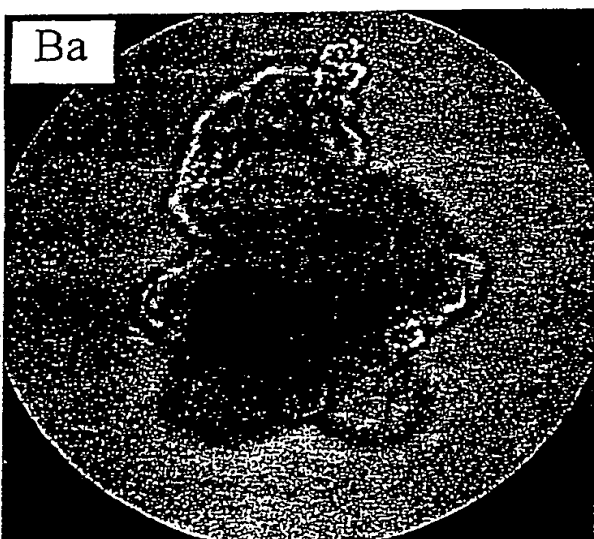
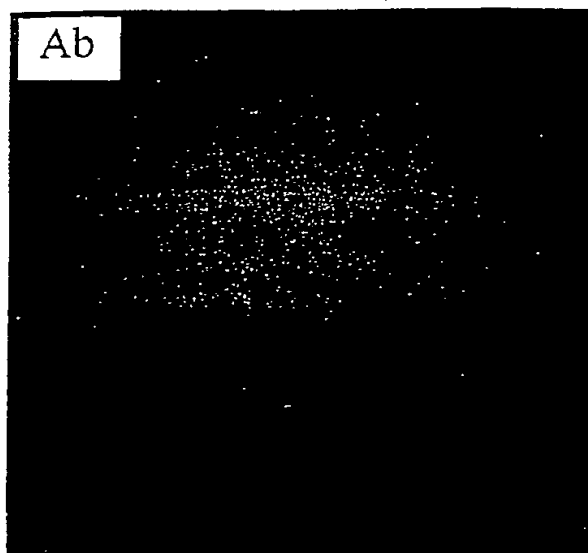
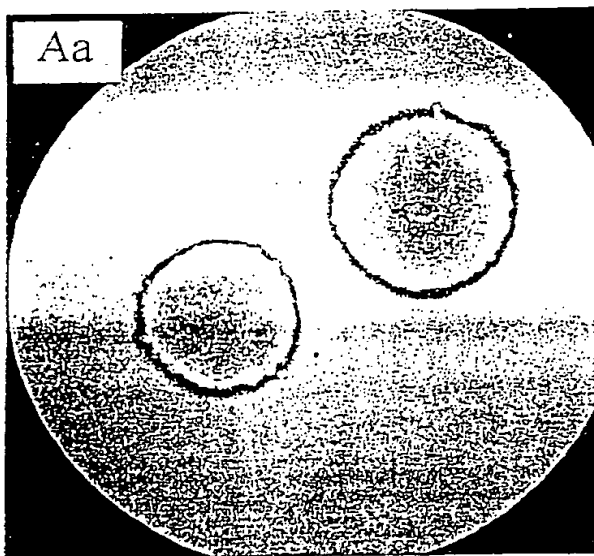
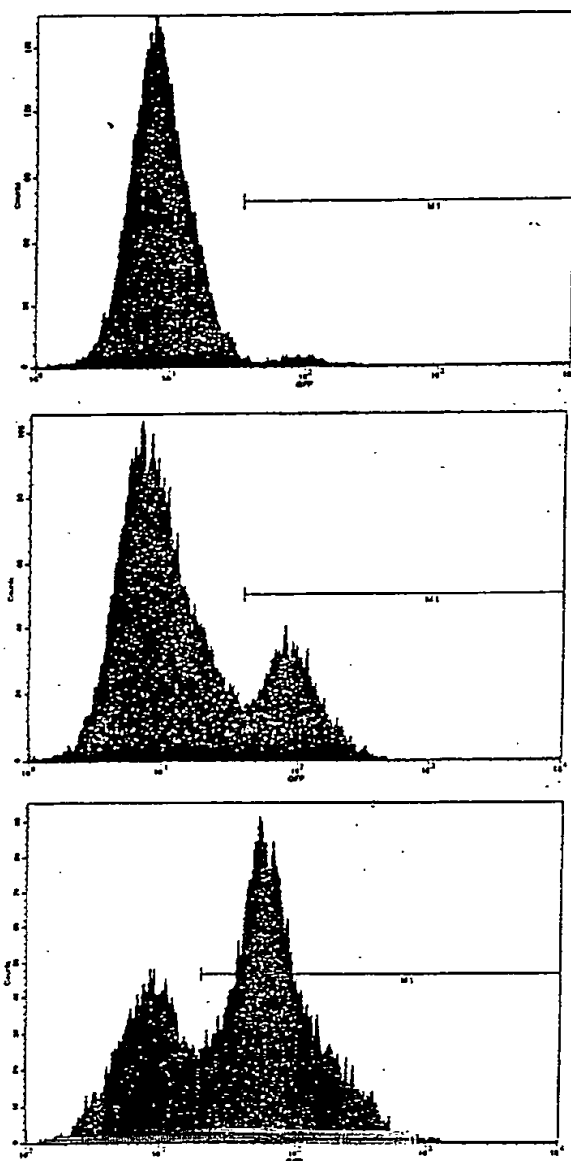


FIG. 4



a

b

c

FIG. 1

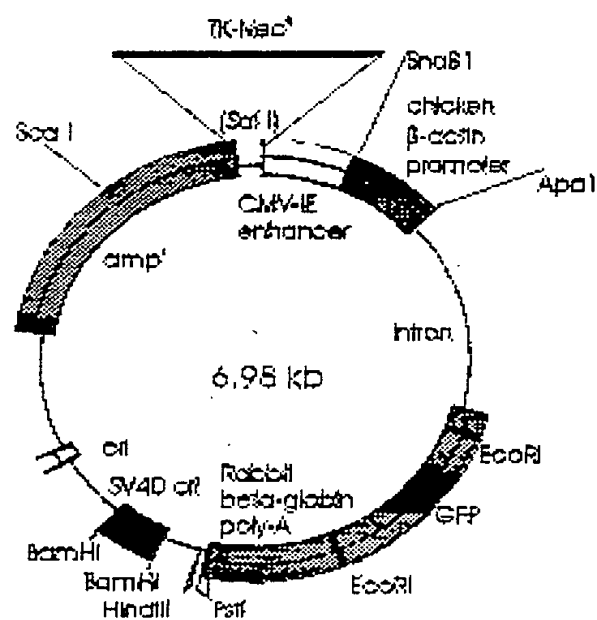
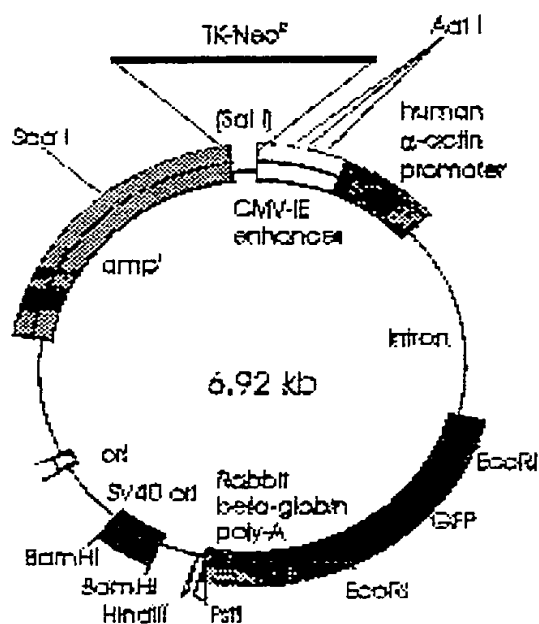


FIG. 2



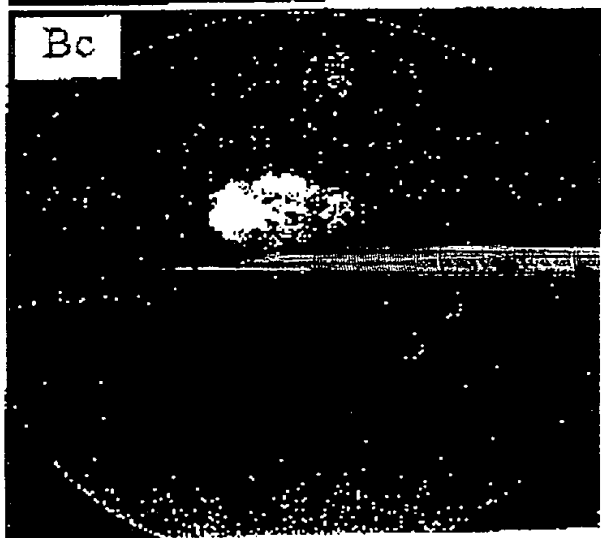
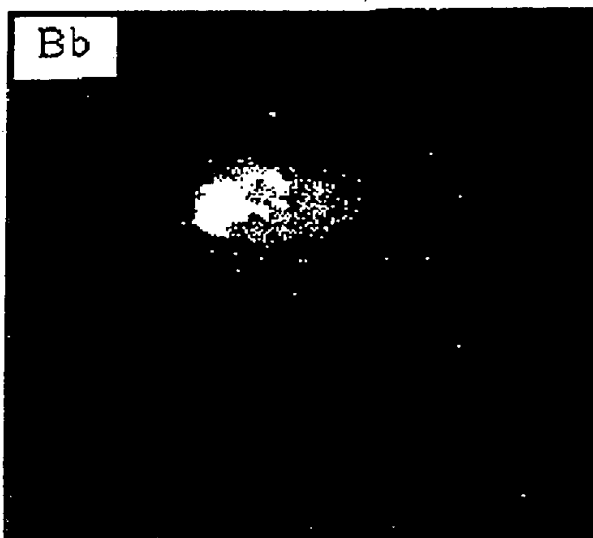
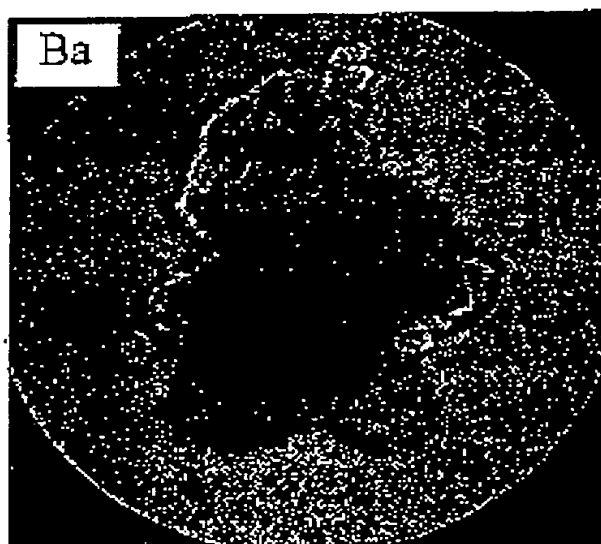
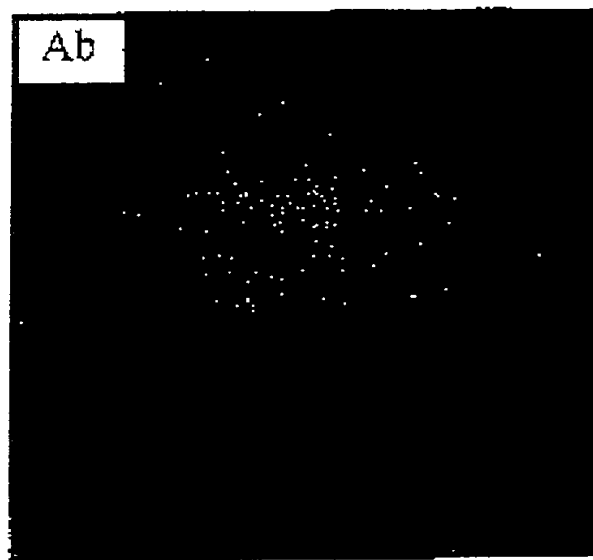
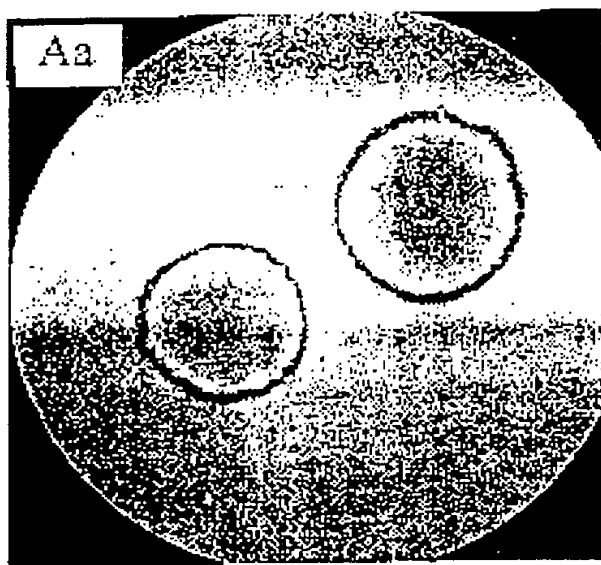
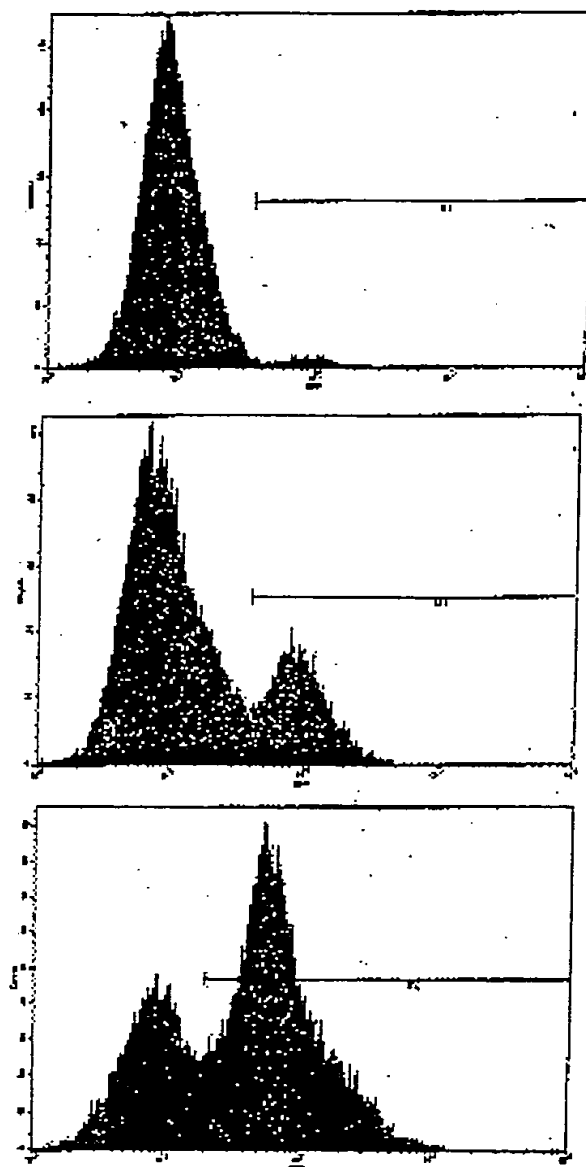


FIG. 4



a

b

c